

**Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Pathológiai Intézet**

Tanszékvezető: Dr. Iványi Béla egyetemi tanár, D. Sc.

6720 Szeged, Állomás u. 2. (6701 Szeged, Pf. 427.)

Tel: 62-545 878, 62-545148

Fax: 62-545 868

Dr. Sági Zoltán: „A csont és lágyrészdaganatok genetikai és molekuláris szerveződésének feltérképezése és alkalmazása a patológiai diagnosztikában” című MTA Doktora Pályázat bírálata

Az értekezés megfelel az MTA Doktora Pályázat formai követelményeinek. Tartalomjegyzék, bevezetés, módszer, eredmények és megbeszélés, új megállapítások, irodalomjegyzék, köszönetnyilvánítás, közleményjegyzék, közleményjegyzék áttekintő adatai fejezetekre tagolódnak, 144 oldal terjedelmű. Az eredményeket kiváló minőségű ábrák, fényképfelvételek illusztrálják, az adatokat táblázatok foglalják össze. A hivatkozások száma a saját közlésekkel együtt 247, a számozást igényesen, névsor szerint végezte.

Dr. Sági Zoltán a magyar patológustársadalom kiemelkedő alakja, nemzetközi ismertségű lágyrészpatóológus. Diagnosztikus és kutató munkája az Országos Onkológiai Intézet Patológiai Osztályán indult, majd a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai Intézetében teljesedett ki, vizsgálatai hátterét az I. sz. Patológiai Intézet professzionálisan működő immunhisztokémiai és molekuláris patológiai laboratóriumai biztosítják. A legkorszerűbb metodikákkal végzett diagnosztikus tevékenysége lehetővé tette az egyes lágyrészdaganatok különböző szempontú vizsgálatához szükséges esetszám összegyűjtését, a rangos folyóiratokban közölt önálló, invenciózus kutatómunkát. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impact faktora 50.638. Sági dr. a disszertációban 6 célkitűzést fogalmazott meg:

- 1) A molekuláris módszerek alkalmazhatósága és haszna a preoperatív (aspirációs citológiai) diagnosztikában
- 2) A molekuláris diagnosztika szükségessége, prognosztikai és prediktív értéke a mindennapi rutin szövettani diagnosztikában
- 3) Az óriássejtes csonttumor genetikai eltéréseinek a vizsgálata
- 4) A synoviális sarcoma genetikai eltéréseinek és jelút-rendszereinek vizsgálata
- 5) A perifériás idegtumorsek genetikai instabilitásának vizsgálata
- 6) A gastrointestinalis stromális tumor (GIST) mTOR jelútrendszerének vizsgálata a molekuláris eltérések függvényében.

A disszertációban és a tézisekben szereplő tudományos eredmények eredetiek, hiteles adatokat tartalmaznak, alkalmasak a célkitűzések megválaszolására. **A nyilvános vita kitűzését és a disszertáció elfogadását javaslom.**

Részletes bírálat

1) A molekuláris módszerek alkalmazhatósága és haszna az aspirációs citológiai diagnosztikában

94 lágyrészdaganat komplex aspirációs citológiai vizsgálata (citomorfológia, immuncitokémia, citogenetika, DNS index) alapján diagnosztikus algoritmust állított fel, az alábbiak szerint:

a) Definitív diagnózisú, rosszindulatú lágyrészdaganat

Klinikai konzekvencia: a preoperatív diagnózis ismeretében az entitásnak megfelelő sebészi és egyéb kiegészítő terápia

b) Magas malignitású sarcoma

Klinikai konzekvencia: radikális műtét a magas malignitású sarcomák kezelési elvei szerint

c) Jóindulatú lágyrészdaganat

Klinikai konzekvencia: egyszerű kimetszés elegendő

d) Kérdéses biológiai viselkedésű lágyrészdaganat

Klinikai konzekvencia: szélesen az épben végzett kimetszés javasolt, a teendőket illetően meg kell várni a műtéti készítmény patológiai vizsgálatát. Nem ajánlott az excíziós biopszia, a preoperatív kemoterápia, vagy az amputáció.

Az algoritmus alapján a sebész teendője egyértelmű, a FISH-technika alkalmazásával végzett citológiai mintavétel szövettani diagnózissal egyenértékű diagnózist biztosít.

Kérdés: Szükséges-e a DNS index és a proliferációs index vizsgálata, ha a FISH vizsgálat diagnosztikus transzlokációt igazol? A 4 csoport esetszáma (16+22+29+20) összesítve 87. A fennmaradó 7 esetre nem találtam utalást. Ezeket valamilyen okból ki kellett venni az osztályozásból?

2) A molekuláris diagnosztika szükségessége, prognosztikai és prediktív értéke a szövettani diagnosztikában

A jelölt ebben a fejezetben először a gastrointestinalis stromális tumorok (GIST-ek) differenciáldiagnosztikájával és prediktív faktoraival foglalkozik. Mint ismeretes, a GIST-ek immunhisztokémiai kit (CD117)-pozitív daganatok, a tápcsatorna pacemaker sejtjeiből indulnak ki. A GIST-ek jellemző molekuláris eltérése a növekedési faktor receptort kódoló KIT gén mutációja, mely a gyakoriság csökkenő sorrendjében a juxtamembrán domént kódoló 11-es exonban (az esetek 70%-a), a ligand-kötő extracelluláris domént kódoló 9-es exonban, valamint a citoplazmatikus tirozin kináz doméneket kódoló 13-as és 17-es exonban jön létre. A 11-es, ill. a 13-as exon mutációját hordozó GIST imatinibre jól reagál, a 9-es exon mutációját hordozó GIST emelt dózisu imatinib kezelést igényel, míg a 17-es exon mutációjára pozitív GIST nem reagál az imatinibre.

Az immunfestéssel kit-negatív esetekben a PDGF receptor alfa gén mutációja igazolható. A mutációs státusz a gyakoriság csökkenő sorrendjében a 18-as, a 12-es, valamint a 14-es exon. A 18-as exon mutációs esetek imatinibre és sunitinibre rezisztensek. A GIST-ek 12-15%-ában nem mutatható KIT/PDGFR gén mutáció (ún. vad típusú GIST).

A GIST-ek kórismézése Sági dr. gazdag tapasztalata szerint két szempontból problematikus. Előfordul, hogy a GIST morfológiai képe vagy az elhelyezkedése nem típusos (skeinoid rostos GIST, kit-negatív GIST, extragastrointestinalis GIST), máskor pedig a leletezendő daganat morfológiailag vagy immunfestődési sajátosságokban hasonlít a GIST-hez. Sági dr. inflammatoricus fibroid polyp, soliter fibrosus tumor, folliculáris dendriticus reticulumsejtes sarcoma, sarcomatoid carcinoma áttét, kalcifikálódó fibrosus pseudotumor, mesenterialis fibromatosis, továbbá myogén és neurogén daganatok eseteiben mérlegelte a GIST lehetőségét. Az értekezés minőségi felvételeken mutatja be a GIST-ek kórismzésének a nehézségeit.

Sági dr. rutinszerűen elvégzi a közepes és magas kockázatú GIST esetek mutációs analízisét. A vizsgálat a beteg egyénre szabott terápiáját messzemenően kiszolgáló, élenjáró gyakorlatot tükröz, mert például az USA-ban 2011. októberében még nem volt ajánlott a GIST rutinszerű mutációs analízise.

Az értekezés 195 GIST mutációs státuszát közli, a figyelemre méltó eredményeket viszonylag szűkszavúan elemzi. Jelölt anyagában a KIT-gén 11-es exonjának a mutációja 42%-ban, a PDGFRA gén 10-es exonjának a mutációja 2.5%-ban, a vad típusú GIST pedig 39%-ban fordult elő. Mi lehet az irodalmi adatoktól eltérő mintázateloszlás oka? A gyomor epitheloidsejtes GIST-jeire jellemző a PDGFRA gén mutációja. Jelölt anyagában érvényesült-e ez az összefüggés? A PDGFRA gén 10-es exonján 5 esetben észlelt mutáció értékes megfigyelés, mert a 10-es exon mutációs eltéréseit az összefoglaló közlemények nem tárgyalják. Sági dr. a vad típusú GIST-ek magas gyakoriságát azzal magyarázza, hogy hozzá a problémás GIST-ek érkeznek konziliumba. A magyarázatot alátámasztaná, ha a jelölt nem-konziliumi és konziliumi GIST anyagában a mutációs mintázat megoszlásában statisztikailag szignifikáns különbséget találna. A KIT-gén 9-es exonjának a mutációs gyakorisága egyezett az irodalomban közltekkel. Ez a mutáció a vékonybél GIST-jeire a jellemző. Így van ez a jelölt anyagában is?

Megjegyzés a 36. oldal, 5. sorhoz: „Új mutációt találtunk, melyeket publikáltunk, így egyben a nemzetközi adatbázis részévé vált” mondat nyelvtanilag helytelen, hivatkozást nem ad meg.

Sági dr. példás módon nemcsak a mutációs státuszt, hanem a GIST-ek DNS tartalmát is elemezte. Az alacsony rizikójú GIST-eket diploidnak, a magas rizikójú GIST-eket aneuploidnak, a közepes kockázatú GIST-eket pedig vagy diploidnak, vagy aneuploidnak találta. Az aneuploid esetek rosszabb prognózisának bizonyultak (numerikus adatot, szignifikancia értéket nem közölt).

A 2. fejezet értékes, rangos lapokban közölt esetismertetésekkel folytatódik. Ezekben a jelölt bemutatja, hogy a molekuláris vizsgálatok és a DNS tartalom elemzése miként segítette a diagnózis felállítását a

különbféle lágyrészdaganatokban (pleura kis kereksejtes desmoplaticus tumora, lágyrészek malignus myoepithelialis daganata, alveoláris lágyrészsarcoma, rhabdoid tumor, lipomák/liposarcomák elkülönítése). Magyarországon elsőként vizsgálta a telomeráz aktivitását lágyrészdaganatokban, az INI1 szuppresszor gént rhabdoid morfológiájú daganatokban, az MDM2 és a CDK4 amplifikációt lipomatózus daganatokban, a béta-katenin mutációt fibromatózisokban.

3) Az óriássejtes csonttumorok genetikai eltérései

Az osteoclastomák az esetek többségében jóindulatúak, de kiújulhatnak és rosszindulatúvá is válhatnak. Jelölt az óriássejtes csonttumor kialakulásának a vizsgálatát és a biológiai viselkedést előrejelző tényező keresését tűzte ki célul. Kinyerték a CD68-negatív daganatos orsósejteket. A genetikai instabilitás vizsgálatára a 3-as, a 4-es, a 6-os, a 11-es és az X-es kromoszómák számbeli eltéréseit és a 11 p telomerikus régió eltéréseit FISH technikával elemezték. A génvesztéseket és a génnyeréseket array komparatív genomikus hibridizációs technikával mutatták ki. A daganatos orsósejtek ploiditását citofotometriával határozták meg. Vizsgálták a centroszóma mintázatát benignus, recidív, valamint malignus osteoclastomákban.

A ploiditást és a kromoszóma instabilitást 52 eset fagyasztva tárolt szövetmintáin elemezték, az átlagos utánkövetési idő 4 év volt. A centroszóma eltéréseit 100 óriássejtes csontdaganaton vizsgálták.

A CD68-negatív orsósejtek DNS index értéke és a klinikai viselkedés alapján 5 csoportot képeztek

- a) diploid nem-recidív
- b) tetraploid nem-recidív
- c) diploid recidív
- d) tetraploid vagy aneuploid recidív
- e) malignus

és azt találták, hogy a ploiditásból a biológiai viselkedésre nem lehetett egyértelműen következtetni. A centroszóma sokszorozódása szignifikánsan magasabb volt a recidív és a malignus csoportokban. Szignifikáns korrelációt találtak a centroszóma számbeli eltérései és a kromoszóma instabilitás között. Szignifikánsan magasabb random egyedi-sejtes aneuszómia állt fenn a recidív daganatokban, a klonális kromoszóma eltérések pedig a malignus csoportot jellemezték. Az aneuszómia tendenciája és csak a rosszindulatú csoportban fennálló klonális eltérések alapján feltételezik, hogy az óriássejtes csonttumor genetikai instabilitásában biológiai kontinuitás lehet. Az óriássejtes csontdaganat biológiai viselkedését biztosan előrejelző markert nem sikerült találniuk. A DNS tartalom mérése, a kromoszómális aneuszómia mértéke (több mint 20%), valamint a centroszóma amplifikációk FISH-technikával történő meghatározása együtt segíti a recidiva hajlam, ill. a malignus átalakulás kockázatának a megbecsülését.

4) A synoviális sarcoma genetikai eltéréseinek és jelút-rendszereinek vizsgálata

A synoviális sarcoma tisztázatlan hisztogenezisű carcinosarcoma. Immunfenotípusára jellemző a vimentin, a keratin és az EMA együttes kifejeződése. Molekuláris markere a t(X;18) (p11.2;q11.2) transzlokáció, mely a 18-as kromoszómán elhelyezkedő SYT gént és az X kromoszómán elhelyezkedő SSX1, SSX2 - és igen ritkán - az SSX4 gént érinti. A kórjóslat függ a beteg korától, a daganat nagyságától, a gyengén differenciált területek arányától és a rezekabilitástól.

Jelölt a DNS-tartalom és a Her-2 génamplifikáció prognosztikai értékét vizsgálta synoviális sarcoma 20 esetében DNS citometriával, valamint a HER2 fehérje immunhisztokémiai kifejeződésével, ill. a génamplifikáció FISH-technikával történő kimutatásával. Az esetek meghaladták az 5 cm-t, nem tartalmaztak szövettanilag gyengén differenciált területeket. Az átlagos életkor 39 évnek bizonyult. Jelölt a 9. táblázatban foglalta össze a klinikai adatokat, a Her-2 státuszt, és a DNS ploiditást. Az utánkövetés idejére nem találtam adatot. A kiújulásra és az áttetre vonatkozó adatok a táblázatban zsúfolódtak és összezsúsztak, ezért biztonsággal nem tudtam összegezni a csak recidívás, a csak áttétes, ill. a recidívás és áttétes betegek számát, és az így kapott csoportokban a Her-2 státuszt és a DNS-ploiditást.

A DNS index 6 betegben aneuploidnak, 14 betegben diploidnak bizonyult. A HER-2 onkogén amplifikációját három esetben észlelte, áttétképződés egyik esetben sem jelentkezett, a daganat 2 esetben kiújult. Statisztikai összefüggést keresett a HER-2 státusz, a DNS-ploiditás és a prognózis között. A HER-2 onkogén amplifikációja és az áttétképzés hiánya között korrelációt talált. Nem volt szignifikáns kapcsolat a recidívák és az amplifikáció között, a HER-2 státusz és a ploidityás között, valamint a ploidityás, a metasztázisképzés vagy a recidiva kialakulása között. Az eredmények nem meglepőek, hiszen a vizsgálati

esetszám eleve kevés volt. A recidivakockázat fontos tényezője a rezekciós vonal tumormentessége, erre vonatkozóan nem találtam adatot. Jelölt vizsgálatait alapján megállapítható, hogy a HER2 onkogén amplifikációja ritkán jön léte synoviális sarcomákban.

Jelölt a synoviális sarcoma kimerikus fehérjéjének a tumorprogresszióért felelős jelutakra gyakorolt hatását kutatta. 50 synoviális sarcomában tissue microarray technikával a tirozin kináz receptorok, a RAS, az AKT/mTOR, a MAP kináz, a WNT, az apoptózis szabályozók, továbbá a sejtciklus szabályozók jelútjait vizsgálta. 38 sarcoma volt a specifikus transzlokációra pozitív, 12 pedig negatív. Mindkét csoportban a jelutak aktivitását észlelte. A pozitív és a negatív csoportban az egyes jelutak aktivitásának százalékos megoszlásában csupán a béta-katenin (80% vs 58), a PTEN (95% vs 67%) és a p4EBP1 (40% vs 91%) vonatkozásában észlelt jelentős különbséget. Mivel a transzlokációra pozitív és negatív esetekben hasonló volt a jelútrendszerek aktivitása, a kimerikus fehérjéjének a tumorprogresszióban valószínűleg kevés a szerepe.

5) A perifériás idegtumorok genetikai instabilitásának vizsgálata

A perifériás idegtumorok egyes típusainak a kórismézése nagy tapasztalatot igényel. Jelölt ezeknek a daganatoknak a ploiditását, valamint kromoszómális instabilitását vizsgálta abból a célból, hogy a kórisme felállítását segítő adatokat szerezzen. 27 schwannoma, 9 neurofibroma (közülük 1 atipusos) és 8 malignus perifériás ideghüvely tumor adszorpciós citofotometriás DNS vizsgálatát végezte el, valamint a 7-es, a 17-es és a 18-as kromoszóma számbeli eltéréseit FISH-technikával elemezte. Az összes schwannoma és neurofibroma, továbbá 3 malignus perifériás ideghüvely tumor diploidnak bizonyult. A schwannomák szubtypustól függetlenül poliploid vonást mutattak, több mint 10%-os 4c csúcsértékkel. Jelölt ezeket az adatokat figyelembe veszi a schwannomák leletezésekor. A schwannomákban ritkán, az összes sejt 2.58%-ában talált aneuszómiás sejteket. Az aneuszómiás sejtek arányát atipusos celluláris neurofibroma esetében 18.4%-nak találta, ezt az emelkedést a malignus transzformáció kockázati tényezőjeként értékelte.

6) A GIST mTOR jelútrendszerének vizsgálata a molekuláris eltérések függvényében

Bár az imatinib az áttétes GIST-ek mintegy 80%-át kedvezően befolyásolja, előfordul, hogy a kezdetben jól reagáló daganat új mutációk révén rezisztenssé válik. Az elsődleges és a másodlagos rezisztencia legyűrésére új tirozin kináz gátlókat fejlesztettek ki. Mivel sejtvonalakban az Akt/mTOR kináz ösvényt gátló rapamycin fokozta a sunitinib GIST-gátló hatását, az mTOR jelútnak szerepe lehet a GIST-ek terápiás befolyásolásában.

Ezért a jelölt az mTOR jelút aktiválódását vizsgálta a jelút-célfehérjék immunhisztokémiai kimutatásával tissue microarray technikával 73 KIT-mutált, 12 PGDFRA-mutált és 23 vad típusú GIST esetében. Az mTOR jelút aktiválódását észlelte a vad típusú és a PDGFRA-mutált GIST-ek többségében, valamint a KIT-mutált GIST-ek több mint harmadában. Eredményei arra bátorítanak, hogy a mutáció státusz megjósolhatóan imatinib rezisztens eseteiben érdemes a rapamycint a tumorelles kezelésbe bevonni.

Összefoglaló vélemény

Az értekezés főlényes diagnosztikus tapasztalatot és metodikai jártasságot tükröz. A lágyszövetdaganatok kórismézésének pontosítására, valamint az egyes lágyszövetdaganatok molekuláris mintázatának a megismerésére irányuló célkitűzések megvalósultak. Az értekezés világosan fogalmazott, az illusztráció igényes.

Az eredmények közül az alábbiakat tartom különösen értékesnek:

- 1) A lágyszövetdaganatok aspirációs citológiai vizsgálatában a metodikai paletta kiszélesítésével diagnosztikus algoritmust dolgozott ki, mely alapján a végtagmegtartó műtétek tervezhetők és indikálható a neoadjuváns kezelés.
- 2) Bevezette és rutinszerűen vizsgálja a gastrointestinális stromális tumorok mutációs státuszát, ezzel diagnosztikus biztonságot és terápiás javaslatot nyújt. A PDGRA-mutált és a vad típusú GIST-ekben az mTOR jelútrendszer aktiválódását figyelte meg.
- 3) Az óriássejtes csontdaganatok biológiai viselkedésének előrejelzésében a ploiditás, a kromoszómális aneuszómia mértéke, valamint a centroszóma amplifikáció együtt támpontot adhat a prognózisra.
- 4) Schwannomákban ritkán, alacsony százalékban előfordulhat aneuszómia.

- 5) Synoviális sarcomákban a specifikus t(X;18)(p11;q11) transzlokáció a daganat keletkezésének korai lépése. A HER2 onkogén amplifikációja ritka synoviális sarcomákban.

A bírálatomban megfogalmazott kérdések csupán egyes részletek pontosítását célozzák.

A nyilvános vita kitűzését és a disszertáció elfogadását javaslom.

Dr. Iványi Béla
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora

Szeged, 2012. január 16.